

Abstract

Sphingosine kinases (SPHK) are important to determine cells' fate by producing sphingosine 1-phosphate. Reportedly, exogenous SPHK2 overexpression induces cell cycle arrest or cell death. However, the regulatory mechanism of SPHK2 expression has not been fully elucidated. Here, we analyzed this issue using human colon cancer cell lines under various stress conditions. Serum depletion (FCS(-)) but not hypoxia and glucose depletion increased mRNA, protein and enzyme activity of SPHK2 but not SPHK1. In HCT 116 cells mostly used, SPHK2 activity was predominant over SPHK1, and serum depletion increased both nuclear and cytoplasmic SPHK2 activity. Based on previous reports analyzing cellular response after serum depletion, the temporal changes of intracellular signaling molecules and candidate transcription factors for SPHK2 were examined using serum-depleted HCT116 cells, and performed transfection experiments with siRNA or cDNA of candidate transcription factors. Results showed that the rapid and transient JNK activation followed by CREB activation was the major regulator of increased SPHK2 transcription in FCS(-) culture. EMSA and ChIP assay confirmed the direct binding of activated CREB to the CREB binding site of 5' SPHK2 promoter region. Colon cancer cells examined continued to grow in FCS(-) culture, although mildly, while hypoxia and glucose depletion suppressed cell proliferation or induced cell death, suggesting the different role of SPHK2 in different stress conditions. Because of the unique relationship observed after serum depletion, we examined effects of siRNA for SPHK2, and found the role of SPHK2 as a growth or survival factor but not a cell proliferation inhibitor in FCS(-) culture.

**Increased SPHK2 transcription of human colon cancer cells in serum-depleted culture
: the involvement of CREB transcription factor**

(ヒト大腸癌細胞株における転写因子 CREB を介した血清除去時 SPHK2 発現増加機序)

水谷 直貴

【緒言】

スフィンゴ脂質は細胞生存、細胞増殖、細胞死、分化、遊走、および炎症などの様々な細胞機能を調節する細胞内、細胞間シグナル伝達物質である。スフィンゴ脂質の中でもセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) は主要な役割を果たし、細胞内のセラミド、S1P のバランスが細胞の運命を決定するというレオスタットモデルが提唱されている。スフィンゴ脂質代謝には多くの酵素が関与しているが、中でもスフィンゴシンキナーゼ (SPHK) は S1P 産生酵素であり、SPHK1、SPHK2 の二つのアイソザイムが存在する。SPHK1 は様々な細胞外刺激により発現や活性が調節されており、その発現増加は細胞表面受容体を通して細胞の生存、増殖、運動に働くことが知られている。

一方で SPHK2 については、SPHK1 と同様に S1P を産生する酵素でありながら、過剰発現によって細胞周期の停止や細胞死を誘導するといった報告と、マウスモデルにより、SPHK2 過剰発現が細胞増殖能や癌の促進に働くという報告がなされている。

癌細胞における内在性の SPHK2 の発現は細胞種によって異なり、同様に細胞内の局在についても細胞により様々であることが報告されている。さらには細胞質と核との間での局在変化も過剰発現系で証明されている。SPHK2 の機能の違いの詳細を解明するためにも、SPHK2 の発現調節機構を明らかにすることは重要と考えられる。

今回我々はストレス刺激下（低酸素、低グルコース、無血清）にける細胞内 SPHK2 の変化を解析した。中でも無血清刺激によって SPHK2 の上昇が認められ、その発現上昇機序の詳細を解析した。

【方法】

細胞株は大腸癌細胞株 HCT116 細胞、RKO 細胞、DLD-1 細胞、HT29 細胞を用いた。低酸素下での培養は Personal CO2/Multigas incubator APM-30D を用いて 1% O₂ 条件にて行った。低グルコース刺激は、Glucose (-)Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

培養液にて行った。無血清培養は FCS (-) DMEM 培養液にて行った。mRNA 発現量の測定は定量 RT-PCR、タンパク発現量は Western Blotting、プロモーター解析はルシフェラーゼレポーターアッセイ、転写活性の測定は Nuclear Run On assay にて行った。プロモーター領域への転写因子の結合は、HCT116 細胞の核タンパクと CREB 結合領域を含むように設定した DNA プローブを用いたゲルシフトアッセイ、DNA pull-down assay を用いて行った。また、*in vivo* での結合評価をクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を用いて行った。SPHK 活性は基質として C17 スフィンゴシンを用いて酵素反応を行い、生成した C17 S1P を Acquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, USA) ならびに 4000 QTRAP LC/MS/MS (ABSciex, Framingham, MA, USA) を用いて測定し算出した。細胞増殖能はトリパンブルー染色後細胞数を測定して評価した。CREB 過剰発現細胞株は CREB cDNA と GFP が組み込まれた発現ベクターを遺伝子導入し、G418 でセレクションを行い、FACS Area2 (BD, San Jose, CA, USA) を用いて GFP 陽性細胞を回収したのちに、単クローンを得た。細胞への siRNA の導入は Lipofectamine RNAiMAX を、プロモーターレポーターベクター、発現ベクターの導入は Lipofectmine 2000 を用いて行った。

【結果】

大腸癌細胞株を低酸素、低グルコース、無血清条件下で培養し、SPHK の発現変化を調べたところ、低酸素、低グルコースでは細胞間でばらつきがありながらも SPHK2 は減少傾向が認められた。一方で、無血清条件下では 4 種類の大腸癌細胞株すべてにおいて、SPHK2 の転写活性、mRNA、タンパク、酵素活性の増加が認められた。また、SPHK2 は SPHK1 に比べて高い活性値を示し、大腸癌細胞では SPHK2 が主に S1P の産生を担っていると考えられた。各ストレス刺激下での細胞増殖能を評価した結果、低酸素、低グルコース条件では細胞増殖は完全に停止した。しかし、無血清培養下では緩やかに増殖を続けた。siRNA を用いて、無血清培養下での SPHK2 の上昇を抑制したところ、増殖は抑制された。無血清培養時の SPHK2 発現増加機序を明らかにすべく、無血清培養後経時的に細胞内シグナル伝達経路の活性化を検討したところ、血清除去後 30 分から 6 時間で JNK 経路の一過性の活性化が認められた。また、SPHK2 のプロモータープロファイルの解析結果から、新たに同定した転写開始点からおおよそ 180 bp 上流に存在する CREB/ATF 結合予想部位の重要性が明らかとなった。JNK によって活性化され、プロモーターへの結合が予想された転写因子 ATF2、cJUN、CREB について無血清培

養後のリン酸化による活性化動態を解析した結果、CREB、cJUN の活性化が認められた。さらに、siRNA にて転写因子を抑制すると CREB 抑制時に SPHK2 のプロモーター活性、mRNA 発現量の減少を認めた。また、JNK 経路の阻害剤 SP600125 を用いて JNK 阻害時には無血清培養による CREB のリン酸化、SPHK2 の発現上昇が抑制されたことから、JNK の活性化が CREB の活性化、SPHK2 の発現上昇に寄与していることが考えられた。続いて、CREB の過剰発現株を用いて無血清培養を行うと、SPHK2 の発現増加がより強く起こり、siRNA にて CREB を抑制した条件で無血清培養を行うと、SPHK2 の発現増加が転写活性、mRNA、タンパク発現量、酵素活性すべてで相殺された。また、無血清培養による SPHK2 の発現増加は細胞質、核、ミトコンドリア全てで起こることが明らかになった。さらには、プロモーター領域への CREB の結合が無血清除去下で増加することを DNA pull-down assay、ChIP assay にて明らかにした。

【考察】

腫瘍細胞の増殖による低血流や低酸素などに代表されるストレス刺激を大腸癌細胞にて評価した結果、低血流を模した無血清培養下で SPHK2 の発現増加を認めた。この発現増加機序について詳細に解析した結果、JNK 経路の活性化により転写因子 CREB の活性化が誘導され、活性化した CREB が SPHK2 プロモーター領域に結合することで SPHK2 転写が誘導されるということが明らかとなった。無血清培養時に SPHK2 を抑制することで細胞増殖が抑制されたことから、腫瘍細胞は低血流状態で SPHK2 を増加させることにより、産生した S1P が細胞内外でシグナル伝達物質として作用することが考えられ、その結果、低血流条件での細胞増殖、生存を刺激していることが考えられる。一方で低酸素や低グルコースでは SPHK2 の発現は減少傾向で、細胞増殖も認められなかった。このことから、低血流状態とは違った調節機構が存在する可能性が考えられる。

【結語】

ヒト大腸癌細胞において、無血清培養下では JNK、CREB を介した SPHK2 の発現上昇が認められ、増加した SPHK2 は細胞増殖、生存に働いていることが示唆された。